

AN 1988-186414 [27] WPIDS

DNC C1988-083174

TI Gamma-halo-8-hydroxy butyrate ester prodn. - by converting gamma-halo acetoacetate ester using culture broth, cells or treated cells of specified microorganism.

DC B05 D16 E16

PA (ELED) DENKI KAGAKU KOGYO KK

CYC 1

PI JP 63123387 A 19880527 (198827)* 8p <--

ADT JP 63123387 A JP 1986-268678 19861113

PRAI JP 1986-268678 19861113

AN 1988-186414 [27] WPIDS

AB JP 63123387 A UPAB: 19930923

In the prodn. of gamma-halo-beta-hydroxybutyrate ester, culture broth, cells or treated cells of bacteria capable of converting gamma-haloacetoacetate ester into corresp. gamma-halo-beta-hydroxybutyrate ester acts on gamma-haloacetoacetate ester and the prod. is collected.

Usable bacterial strains are *Aureobacterium terregens* IFO 12961, *Alcaligenes faecalis* IFO 12669, *Agrobacterium radiobacter* IAM 1526, *Arthrobacter simplex* IFO 12069, *Amorphosporangium auranticolor* JCM 3038, *Brevibacterium ammoniagenes* IFO 12071, *Bacillus subtilis* IFO 3037, *Corynebacterium glutamicum* No. 534 ATCC 13032, *Cellulomonas* sp. AKU 672, *Escherichia coli* K12 IFO 3208, *Enterobacter aerogenes* JCM 1235, *Lactobacillus amylophilus* JCM 1124, *Micrococcus Luteus* IFO 12708, *Micromonospora grisea* JCM 3182, *Nocardia corallina* IAM 12121, *Pseudomonas cruciviae* IFO 12047, *Protomonas extroquens* JCM 2811, *Rhodococcus corallina* JCM 3199, *Streptomyces arabicus* JCM 4161, *Xanthomonas maltophilia* JCM 1975, etc.

USE/ADVANTAGE - Yield of gamma-halo-beta-hydroxybutyrate ester is high. Produced ester is useful as a synthetic material for medicines such as L-carnitine.

0/0

② 公開特許公報 (A)

昭63-123387

④ Int.C1.
C 12 P 7/62類別記号 域内登録番号
7236-4B*

③ 公開 昭和63年(1988)5月27日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

④ 発明の名称 γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルの製造法

④ 特 願 昭61-268678

④ 出 願 昭61(1986)11月13日

④ 発明者 山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

④ 発明者 清水 昌 京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14

④ 発明者 三好 照三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内④ 発明者 加藤 正明 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内④ 発明者 山本 浩幸 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

④ 出願人 電気化学工業株式会社

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

 γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルの製造

法

2. 特許請求の範囲

(1) γ -ハロアセト酢酸エステルを対応する γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルに変換する能力を有するバクテリアの培養液、菌体、又は菌体処理物を γ -ハロアセト酢酸エステルに作用させ、生成物を採取することを特徴とする γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルの製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔医薬上の利用分野〕

本発明は γ -ハロアセト酢酸エステルにバクテリアを作用させて、 γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルを製造する方法に関する。 γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルは γ -カルニチン等の医薬合成原料として有用である。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする問題〕

γ -ハロアセト酢酸エsterを化学的に還元して

対応する γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルを製造する場合、開反応が起こりやすく、目的物の収率が低いという欠点がある。そこでこれらを解決するために、 γ - β -ヒドロキシアシル COA やヒドロゲナーゼを産生する微生物の発酵培养作用を利用する方法(特開昭59-118093号公報)が提案された。しかし、報告されている微生物は、酵母、カビであり、更に、実験室の手段により改良を加えるにあたって有利なバクテリアを利用する方法の確立が求められている。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、 γ -ハロアセト酢酸エステルを対応する γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルに変換する能力を有するバクテリアの培養液、菌体、又は菌体処理物を γ -ハロアセト酢酸エステルに作用させ、生成物を採取することを特徴とする γ -ハロ- β -ヒドロキシ脂肪酸エステルの製造法である。

本発明で用いる γ -ハロアセト酢酸エステルは、
一般式: $R_1 - CH_2CO \cdot CH_2COOR_2$

(式中 R₁ はハロゲンであり、
R₂ はアルキル基、フェニル基、アリ
ール基等の任意の有機基である)

で示される化合物である。

本発明で用いる α -ハロアセト酢酸エステルは、
例えば有機溶媒でハロゲンとジケテンを反応させ
ることにより得られるが、必ずしも α -ハロアセト
酢酸エステルから付属のグリニヤール反応によ
つても製造することができる。

本発明で用いるバクテリアは、 α -ハロアセト
酢酸エステルを対応する α -ハロ- β -ヒドロキ
シ酢酸エステルに変換する能力を有するバクテリ
アであり、例えば、

オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) ■
アルカリゲネス (*Alcaligenes*) ■
アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) ■
アリスロバクター (*Arthrobacter*) ■
アモルフォスボランヤウム (*Amorphosporangium*) ■
■
アムラリエラ (*Ampullariella*) ■

プロトモナス (*Protomonas*) ■
ロドコッカス (*Rhodococcus*) ■
セラチア (*Serratia*) ■
ストレプトマイセス (*Streptomyces*) ■
サーモアクチノミセス (*Thermoactinomyces*) ■
■
ヤサントモナス (*Xanthomonas*) ■
エルシニア (*Yersinia*) ■

に属するバクテリアである。更に具体例をあげると、

オーレオバクテリウム ナレゲンス IFO 12961
(*Aureobacterium terregens*)
アルカリゲネス フアエカリス IFO 12669
(*Alcaligenes faecalis*)
アグロバクテリウム ラジオバクター IAM 1526
(*Agrobacterium radiobacter*)
アリスロバクター シンプレクタス IFO 12069
(*Arthrobacter simplex*)
アモルフォスボランヤウム アウランティカーラ JCM 3038
(*Amorphosporangium auranticolor*)

ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) ■
バチルス (*Bacillus*) ■
コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) ■
セルロモナス (*Cellulomonas*) ■
エシエリキア (*Escherichia*) ■
エンテロバクター (*Enterobacter*) ■
フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) ■
ハフニア (*Hafnia*) ■
クルチア (*Kurthia*) ■
ラクトバチルス (*Lactobacillus*) ■
ミクロコッカス (*Micrococcus*) ■
メタノモナス (*Methanomonas*) ■
メチロバシルス (*Methylobacillus*) ■
ミクロビスボラ (*Micromobispora*) ■
ミクロモノスボラ (*Micromonospora*) ■
ノカルジア (*Nocardia*) ■
プロテウス (*Proteus*) ■
シユードモナス (*Pseudomonas*) ■
ペデオコッカス (*Pediococcus*) ■
プランモノスボラ (*Planomonospora*) ■

アムラリエラ キリニゲリカ JCM 3329
(*Ampullariella cylindrica*)

ブレビバクテリウム アンモニアゲネス IFO 12071
(*Brevibacterium ammoniagenes*)

バチルス ズバチルス IFO 3037
(*Bacillus subtilis*)

コリネバクテリウム グルタミクム ATCC 13032
(*Corynebacterium glutamicum*)

セルロモナス エスピー AKU 672
(*Cellulomonas sp.*)

エシエリキア コリ K 1 2 IFO 3208
(*Escherichia coli*)

エンテロバクター アエロゲネス JCM 1235
(*Enterobacter aerogenes*)

フラボバクテリウム エステロアロマティクム IFO 3751
(*Flavobacterium esteroaromaticum*)

ハフニア アルペイ IFO 3731
(*Hafnia alvei*)

クルチア ソフィ IFO 12083
(*Kurthia sappi*)

ラクトバチルス アミロフィルス JCM 1124
(*Lactobacillus amylophilus*)
ミクロコッカス ルテウス IFO 12708
(*Micrococcus luteus*)
メタノモナス メチロボラ JCM 2848
(*Methanomonas methylovora*)
メチロバシルス グリコゲネス JCM 2850
(*Methylobacillus glycogenes*)
ミクロビスボラ アエラタ JCM 3076
(*Microbispore aerata*)
ミクロモノスボラ グリセア JCM 3182
(*Micromonospora grisea*)
ノカルジア コラリナ IAM 12121
(*Nocardia corallina*)
プロテウス ミラビルス IFO 3849
(*Proteus mirabilis*)
シュードモナス クルシビアエ IFO 12047
(*Pseudomonas cruciviae*)
ペデオコッカス ペントサセウス JCM 2023
(*Pediococcus pentosaceus*)

必要に応じて容易に入手できる菌株である。このうち、セルロモナスエスピーアKU 672株は本発明者らが見いだした菌株であり、工業技術院微生物研究所に登録番号9026番で登録されている。菌学的性質を次に示す。

1. 形態

(1) 菌体の形及び大きさ：

Old culture : 球菌、0.5~0.6 μm
Fresh culture : 不定形、球菌、径0.5~
0.7 μm、長さ>2.0 μm

(2) 多形性の有無：有

(3) 運動性の有無：有

(4) 線毛の有無：有

(5) 鞭毛の有無：無

(6) グラム染色性：陽性

2. 各場所での生育状態

(1) 内汁寒天平板培養

コロニーの色：黄色(2日間培養)

コロニーの形狀：円形、平滑

コロニーの隆起：中央凸状

ミクロモノスボラ ベネズエレシエンシス JCM 3167
(*Micromonospora venezuelensis*)
プロトモナス エクストロタエンス JCM 2811
(*Protononas extroquens*)
ロドコッカス コラリナ JCM 3199
(*Rhodococcus corallina*)
セラチア マルセシエンス IAM 1105
(*Seratia marcescens*)
ストレプトマイセス アラビクス JCM 4161
(*Streptomyces arabicus*)
セモアクテノミセス サッカリ JCM 3157
(*Thermoactinomyces sacchari*)
キサントモナス マルトフィリア JCM 1975
(*Xanthomonas maltophilia*)
エルシニア ルケリ JCM 2429
(*Yersinia ruckeri*)

等である。これらの菌株は財團法人発酵研究所(IFO)、東京大学応用微生物研究所(IAM)、または理化学研究所微生物系保存庫(JCM)、ATCC 等に、それぞれの番号で保管されており、

コロニーの周縁：金綻

(2) 内汁液体培養
菌体、やや沈殿有
(3) 内汁ゼラチン溶剤培養：液化する
(4) リトマスミルク：酸を生成する

3. 生理学的性質

(1) 頸酸塩の發元 : 有
(2) MRテスト : 陰性
(3) VPテスト : 陰性
(4) インドールの生成 : 陰性
(5) 水素水素の生成 : 陰性
(6) チンパンの加水分解 : 陽性
(7) クエン酸の利用 : 陰性
(8) 巴來の生成 : 無
(9) ウレアーゼ : 陰性
(10) オキシダーゼ : 陰性
(11) カタラーゼ : 陽性
(12) 酸素に対する態度 : 好気性
(13) 生育の範囲
範囲 37~42°C

H 6.0 ~ 7.5

④ OPテスト : 発酵

⑤ セルロースに対する作用 : 酸性

⑥ 細胞からの吸収及びガスの生成の有無

糖	吸 収	ガス
① L-アラビノース	+	-
② Arbutin	+	-
③ セルロビオース	+	-
④ ザキストリン	+	-
⑤ D-フラクトース	+	-
⑥ D-ガラクトース	+	-
⑦ D-グルコース	+	-
⑧ グリコーゲン	+	-
⑨ マルトース	+	-
⑩ ダンブン	+	-
⑪ ショ糖	+	-
⑫ トレハロース (trehalose)	+	-
⑬ キシロース	+	-
⑭ グリセロール	-	-
⑮ イヌリン	-	-

⑯ 乳糖 - -

⑰ マニトール - -

⑱ マヌノース - -

⑲ α -メチルグルコシド - -
(α -methylglucoside)

⑳ ラフィノース - -

㉑ ラムノース - -

㉒ ソルビトール - -

㉓ ソルボース - -

㉔ DNA 分解性 : 酸性

㉕ カゼイン分解性
アミノペプチダーゼ活性 : 酸性

㉖ 耐塩性 : NaCl 5%まで生育する

㉗ 細胞壁のアミノ酸 : オルニチン

㉘ 細胞分裂 : 異曲

㉙ DNA の GC 含量 : 74.7%

㉚ スキムミルク中における熱処理:
63°C、30分処理で生存

以上の生物学的性質により、本菌はコリネフォルムバクテリアに属し、山田らの方法 (J. gen.

Appl. Microbiol., 18, 417 (1972))

に基づいて検索すると

① セルロース分解活性が欠損
② 細胞分裂が屈曲型
③ 細胞壁のアミノ酸がオルニチン
④ GC 含量が 71 ~ 73% と範囲が狭く高含量
⑤ 広範囲の糖から発酵により酸を作り

という点から、第 4 グループに属し、セルロモナスエスピードと、同定された。

上記のバクテリアは一般的的性質として自然あるいは人工的手段により変異を起こし得るが、 α -ハロアセト酢酸エステルを基元として α -ハロ- β -ヒドロキシ酢酸エステルに変換するものすべて本発明の製造法に利用し得る。

本発明で用いるバクテリアは常法に従つて培養することができる。培養に用いられる培地はバクテリアの生育に必要な炭素源、窒素源、無機物質等を含む通常の培地である。更にビタミン、アミノ酸等の有機酸栄養素を添加すると望ましい結

果が得られる場合が多い。

培養は好気的条件下に 3 ~ 8、温度 10 ~ 40°C の適当な範囲に制御しつつ 1 ~ 10 日間培養を行う。反応にあたつては、バクテリアの培養液、培養液から分離採取した培養固体などいずれも使用できる。また固体処理物として、凍結乾燥やアセトン乾燥などの方法で得た乾燥固体、固体を磨碎あるいは自己消化、超音波処理などの方法で得た固体破砕液のほか、 α -ハロアセト酢酸エステルを対応する α -ハロ- β -ヒドロキシ酢酸エステルに変換する酵素活性を有する酵素タンパク区分、更にはこれら固体または固体処理物の固定化物、その他いすれも使用できる。

α -ハロアセト酢酸エステルを対応する α -ハロ- β -ヒドロキシ酢酸エステルに変換する方法は、水性媒体中にて α -ハロアセト酢酸エステルと上記バクテリアの培養液、固体、固体処理物あるいはこれらを公知の方法で固定化したものと接触させれば良い。

かかる反応時の水性媒体としては、水、緩衝液

および含水有機触媒が使用できる。

上にバタテリアセト-ハロアセト酢酸エステルに作用させるには、油膏、油セ3-8、反応温度を10~60℃の範囲に制御しつつ行なう。

反応系に対してア-ハロアセト酢酸エステルはそのまま、あるいは触媒に添加するか、あるいは分離させて使用する。

反応系のエステル濃度は油膏0.001~5.0質量%の範囲が良い。かかるア-ハロアセト酢酸エステルの添加は反応の任意の段階で可能であり、一括、連続、分割のいずれの手段でも実用できる。

反応時にグルコース等の糖類や、微生物の栄養液、界面活性剤等を共存させて反応を行なうこともできる。反応時間は、細胞等条件により調整できるが、長くとも48時間程度を行なえば、ア-ハロアセト酢酸エステルは対応するア-ハロ-β-ヒドロキシ酢酸エステルに変換される。

このようにして得られたア-ハロ-β-ヒドロキシ酢酸エステルを培養液又は反応液より採取するには、固体又は固体処理物を遠心分離や膜外離

過等の方法に従つて除去し、エーテル、四塩化炭素、ベンゼン、酢酸エチル等の有機溶媒を用いて抽出する方法等の油膏の方法を採用することができる。

【実施例】

次に、実施例によつて本発明の方法を更に詳しく述べる。

実施例1

グルコース5質量%、コーン・スティーブ・リカ-5質量%からなる培地(pH 6.5) 5mlを試験管に取り、表に示した微生物を接種して28℃で48時間振とう培養を行つた。

この系にア-クロロアセト酢酸メチル2.5mlを添加し、さらに24時間振とう培養を行つて反応を行なつた。

得られた反応液を遠心分離で酵母を処理した後、反応液2mlを酢酸エチル4mlで抽出し、ガスクロマトグラフイー(当用 GC-9 APP, PEG 20M × 1m, 150℃, N₂ 30 ml/min)で分析した。結果を表に示す。

実施例2

ア-クロロアセト酢酸エチルを基質に用いて実施例1と同様に反応を行い、分析した。結果を表に示す。

以下余白

表

バタナリ	生成量 (μmol/g)	
	実験例1	
	ア-クロロ-ブ-ヒ ドロキシ酸メチル	ア-クロロ-ブ-ヒ ドロキシ酸エチル
1. オーレオバタナリウム テレインス IPO 12961	1.1	1.0
2. アルカリゲネス フエカリス IPO 12669	2	2
3. アクロバタナリウム ラジオバクター IAM 1526	1.1	1.0
4. アリスロバタナー シンプレンクス IPO 12069	2.2	2.0
5. アモルフォスボランギウム アクランティカラ JCM 3038	9	8
6. アヌラリエク カリラデリカ JCM 3329	2	2
7. アレビバタナリウム アンモニアゲネス IPO 12071	8	8
8. バナスズズナス IPO 3037	6	6
9. コリネバタナリウム グルタニウム #534 ATCC 15032	2.3	2.1
10. セルロモナス エスピーア IPO 672	3.6	3.3
11. エシエリヤア コリ K12 IPO 3208	0.4	0.3
12. エンテロバタナー アエロゲネス JCM 1235	0.5	0.5
13. フラボバタナリウム エステロアロアティタ IPO 3751	9	8
14. ハフニア ハベイ IPO 3751	3	3
15. タヘナア ハフィ IPO 12083	7	7
16. ラクトバナス アミロフィルス JCM 1124	5	5

バタナリア	生成量 (μmol/g)	
	実験例1	
	ア-クロロ-ブ-ヒ ドロキシ酸メチル	ア-クロロ-ブ-ヒ ドロキシ酸エチル
17. ミクロコッカス ルテウス IPO 12708	2.6	2.4
18. メタノモナス メタロボラ JCM 2848	1	1
19. メタロバシルス グリコゲネス JCM 2850	2	2
20. ミクロビスボラ アエラタ JCM 3076	1	1
21. ミクロモノスボラ グリセア JCM 3182	2	2
22. ノカルジア コラリナ IAM 12121	7	7
23. プロテウス ミラビルス IPO 3849	0.4	0.3
24. シュードモナス クルシビアエ IPO 12047	3	3
25. ベザオコッカス ベントサセウス JCM 2023	2	2
26. ブラノモノスボラ ベネズエレンジス JCM 3167	1	1
27. プロトモナス エクストロタエンス JCM 2811	1	1
28. ロドコッカス コラリナ JCM 3199	2.3	2.1
29. セラテア マルセシエンス IAM 1105	1.0	1.0
30. ストレプトマイセス アラビクス JCM 4161	0.8	0.7
31. サーモアクチノミセス サフカリ JCM 3157	0.6	0.5
32. キサントモナス マルトフイリア JCM 1975	0.6	0.5
33. エルシニア ルケリ JCM 2429	5	5

実施例3

グルコース5重量%、コーン・スタイープリカ-5重量%からなる培地(pH 6.5) 5mlを試験管に取り、セルロースナスエスピーアロ672(東工研農芸試験9026号)を加え、28℃で24時間培養を行う培養を行ない結果を示す。

次に上記と同一組成の培地100mlを500ml密閉ロフラスコに取り、培養液5mlを添加して28℃で培養を行なつた。

得られた培養液を遠心分離し、0.9% NaCl水で洗浄したのち、1(%)をグルコースを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.0) 100mlに添加し、ア-クロロアセト酢酸エチル1.0gを添加し、通気、振とうしながら18時間反応を行なつた。

得られた反応液を遠心分離で酵母処理した後、酢酸エチル300ml(100ml×3回)で抽出を行なつた。この酢酸エチル層に無水硫酸マグネシウムを添加、脱水したのち、減圧濃縮して0.98gの油状生成物を得た。このものを試験結果してIR(島津IR-435)、NMR(日本電子PMX

実施例3と同様にして反応を行ない、ガスクロマトグラフィー(島津GC-9APP、OV-1×1m、125℃、N₂30ml/分)、IR(島津IR-435)、NMR(JEOL GX-270)で確認したところ、ア-クロロ-ア-ヒドロキシ酢酸オクチルであることを確認した。また、反応収率は50%であつた。

尚、過剰は1mlの10% Tween 80 (KAO-ATLAS)で乳化して反応系に添加した。

実施例6

実施例3と同様にして得た酵母体10gを20mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.5)にけん化し、氷水で冷却しながら5分間の超音波処理を4回行い、遠心分離で不溶物を除去することにより、粗酵母液を得た。

この粗酵母液10mlにNADPH(シグマ社)200mgを加え、ア-クロロアセト酢酸エチル2.0gを4時間で分離し、さらに4時間反応を行つた後、実施例3と同様にして反応液を分析したところ、ア-クロロ-ア-ヒドロキシ酢酸エチルの収率は

60%、ガスクロマトグラフィー(島津GC-9APP、PGO 20μm×1m、150℃、N₂30ml/min)で確認したところ、ア-クロロ-ア-ヒドロキシ酢酸エチルであることを確認した。

NMR

δ (CDCl₃中) : δ (ppm)
1.25(3H, t)、2.60(2H, d)、
3.35(1H, s, exchangeable, OH)
3.60(2H, d)、4.2(2H, q)

0℃

R-T(分) 4.6

実施例4

ミクロコッカス ルテウス IPO 12708を実施例3と同様にして培養と反応を行ない生成物を分離したところ0.85gの油状生成物を得た。さらに、実施例3と同様の方法で同定したところ、ア-クロロ-ア-ヒドロキシ酢酸エチルであることを確認した。

実施例5

ア-クロロアセト酢酸オクチルを試験に用いて、

90%であつた。

実施例7

実施例3と同様にして培養し、得られた培養液にシュー-クロース10gを添加し、通気培養しながらア-クロロアセト酢酸エチル1gを8時間で分離し、さらに通気培養を8時間行い実施例1と同様にして反応液を分析したところア-クロロ-ア-ヒドロキシ酢酸エチルの収率は40%であつた。

〔発明の効果〕

本発明によればア-ハロアセト酢酸エチルからア-ハロ-ア-ヒドロキシ酢酸エチルを高収率で得ることができ、工業的に有利である。

第1頁の続き

④Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号
II(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:01)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:05)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:06)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:07)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:13)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:15)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:185)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:20)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:225)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:265)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:29)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:365)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:37)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:38)	
(C 12 P	7/62	
(C 12 R	1:425)	
(C 12 P	7/62	
C 12 R	1:465)	

④Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号
(C 12 P	7/62	
C 12 R	1:64)	